

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平2-304075

⑫ Int. Cl.⁸
C 07 D 303/48
// A 61 K 31/335

識別記号 庁内整理番号
7822-4C
ABE
ABJ

⑬ 公開 平成2年(1990)12月17日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 エボキシコハク酸誘導体

⑮ 特 願 平1-124751

⑯ 出 願 平1(1989)5月18日

⑰ 発 明 者 村 田 充 男 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内
⑱ 発 明 者 横 尾 千 尋 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内
⑲ 発 明 者 花 田 和 紀 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内
⑳ 出 願 人 大正製薬株式会社 東京都豊島区高田3丁目24番1号
㉑ 代 理 人 弁理士 北川 富造

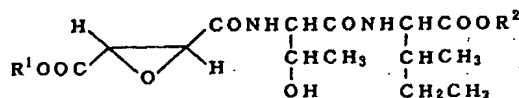
明 細 書

1. 発明の名称

エボキシコハク酸誘導体

2. 特許請求の範囲

(1) 式



(式中、R¹およびR²は同一または異なって水素原子、低級アルキル基またはベンジル基を示す。)で表されるエボキシコハク酸誘導体およびその薬学的に許容できる塩。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はエボキシコハク酸誘導体に関し、更には詳しくはチオール基が活性中心と考えられている

蛋白分解酵素、すなわちチオールプロテアーゼの活性を阻害するエボキシコハク酸誘導体に関する。

従来の技術

従来、チオールプロテアーゼの活性を阻害するエボキシ化合物としては、N-(L-3-トランス-カルボキシオキシラン-2-カルボニル)-L-ロイシルアグマチン[アグリカルチュアルアンドバイオロジカルケミストリー(Agric. Biol. Chem.), 第42巻, 第523~528頁(1978年)]、エボキシサクシニルアミノ酸アミド誘導体(特開昭55-153778号)、エスタチン(特開昭62-76号)などが知られている。

一方、チオールプロテアーゼの一種であるカルシウム依存性中性プロテアーゼ(CANP)およびカタレプシンB、Lなどは、難病である筋ジストロフィー症や空胞型ジスターミオパシーなどの、筋崩壊疾患の原因であると考えられている。従って、これらのチオールプロテアーゼの活性を特異的に阻害する薬剤は、筋崩壊疾患の治療薬と

なり得るものと期待されている。また、チオールプロテアーゼの活性を阻害する物質は抗炎症作用を有するため、抗炎症剤としても有用と考えられている。

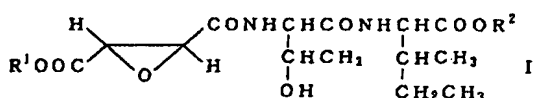
発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、チオールプロテアーゼ、特にカテプシン B に対して強力な阻害活性を有する物質を提供することにある。

課題を解決するための手段

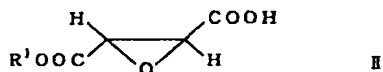
本発明者らは上記目的に鑑みエポキシ環を有する化合物について鋭意検討した結果、チオールプロテアーゼの活性を強力に阻害する新規なエポキシコハク酸誘導体を見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は下記式 I

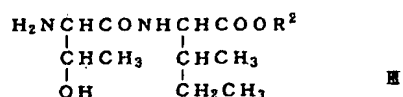


(式中、R¹および R²は同一または異なって水素原子、低級アルキル基またはベンジル基を示す。)

- 3 -



(式中、R¹は前記と同意義である。)で表される化合物と、下記式 III



(式中、R²は前記と同意義である。)で表される化合物または式 III の化合物のトリフルオロ酢酸、塩酸などとの塩を、クロロホルム、酢酸エチル、N,N-ジメチルホルムアミドなどの溶媒中、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド法、混合酸酐無水物法、活性エステル法などペプチド合成化学の分野で通常用いられる方法により縮合し、更に必要に応じてベンジルエステル基などの保護基をメタノール、エタノール、N,N-ジメチルホルムアミドなどの溶媒中、パラメジウム炭素、パラジウム黒などの触媒を用いる接触還元またはカタリ

す。)で表されるエポキシコハク酸誘導体およびその薬学的に許容できる塩である。

本発明において、低級アルキル基とは炭素原子数 1~4 の直鎖状または分枝鎖状のアルキル基であり、たとえばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基などである。

また、本発明において薬学的に許容される塩とは、たとえばナトリウム、カリウム、マグネシウムなどを含む無機塩基(水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、硫酸マグネシウムなど)との塩、アンモニア、トリエチルアミン、シクロヘキシルアミン、アルギニン、リジンなどの有機塩基や塩基性アミノ酸との塩、硫酸、塩酸、硝酸などの鉱酸との塩または酢酸、乳酸、酒石酸、フマル酸、マレイン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸などの有機酸や酸性アミノ酸との塩が挙げられる。

式 I で表される本発明化合物は、たとえば次のような方法で製造することができる。

すなわち、下記式 II

- 4 -

ティクトランスファーハイドロゲネーション (CTH) 法など、ペプチド合成化学の分野で通常用いられる方法により除去することによって、式 I の本発明化合物を得ることができる。

なお、式 II の化合物はケミカル フォーマシューティカル ブルテン (Chem. Pharm. Bull), 第 35 巻, 第 1098~1104 頁 (1987 年) に記載の方法に準じて製造することができる。また、式 III の化合物はスレオニンおよびイソロイシンをペプチド合成化学の分野で通常用いられる方法により縮合することによって製造することができる。

発明の効果

このようにして得られた本発明化合物は、カテプシン B などのチオールプロテアーゼの活性を強力に阻害する。

以下に試験例を示す。

試験例

下記の方法により、CANP、パバインおよびカテプシン B に対する阻害活性を測定し、その結果を表 1 に示した。

〔CANP阻害活性測定法〕

25mM 2-メルカプトエタノール、5mM塩化カルシウム、0.1Mグリセリン酸緩衝液(pH7.5)、0.24%カゼイン、1%ジメチルスルホキシドおよび種々濃度の被験薬を含む反応液0.45mlを30℃で5分間ブレインキュベートした後、5μlのμCANP(50μl)(半井化学薬品製)を加えて反応を開始し、正確に30℃で20分間インキュベートした後、10%トリクロロ酢酸0.5mlを加えて反応を停止させた。室温で60分間放置した後、3000×gで5分間遠心分離し、上清の280nmにおける吸光度を測定した。10%トリクロロ酢酸を、μCANPを加える前に添加して同様に測定したブランク値を差し引き、残存活性を求めた。被験薬を加えないで同様に測定した値を用いて算出した阻害率より50%阻害に必要な被験薬の濃度を算出しIC₅₀値として示した。

〔ババイン阻害活性測定法〕

2.5mM 2-メルカプトエタノール、1mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウム、0.1Mリン酸緩衝液

(pH6.8)、0.1%ブリッジ-35(半井化学薬品製)、1%ジメチルスルホキシドおよび種々濃度の被験薬を含む反応液0.95mlに400nMのババイン溶液(シグマ社製)25μlを加え、40℃で8分間ブレインキュベートした後、200μMベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-アルギニン 4-メチルクマリール-7-アミド(ペプチド研究所製)を25μl加えて反応を開始し、40℃で10分間インキュベートした後、100mMクロロ酢酸ナトリウムを含む100mM酢酸緩衝液1mlを加えて反応を停止させた。遊離した4-メチル-7-アミノクマリンの蛍光を島津蛍光光度計RF-5000を用いて励起波長380nm、蛍光波長440nmで測定した。被験薬を加えないで同様に測定した値を用いて算出した阻害率より、50%阻害に必要な被験薬の濃度を算出しIC₅₀値として示した。

〔カテプシンB阻害活性測定法〕

2.5mM 2-メルカプトエタノール、1mMエチレンジアミン四酢酸ナトリウム、0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)、0.1%ブリッジ-35(半井化学薬品

-7-

-8-

製)、1%ジメチルスルホキシドおよび種々濃度の被験薬を含む反応液0.95mlに200nMのカテプシンB溶液(シグマ社製)25μlを加え、40℃で3分間ブレインキュベートした後、200μMベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-アルギニン 4-メチルクマリール-7-アミド(ペプチド研究所製)を25μl加えて反応を開始し、40℃で10分間インキュベートした後、100mMクロロ酢酸ナトリウムを含む100mM酢酸緩衝液1mlを加えて反応を停止させた。遊離した4-メチル-7-アミノクマリンの蛍光を島津蛍光光度計RF-5000を用いて励起波長380nm、蛍光波長440nmで測定した。被験薬を加えないで同様に測定した値を用いて算出した阻害率より、50%阻害に必要な被験薬の濃度を算出しIC₅₀値として示した。

表1 阻害活性値[IC₅₀(nM)]

被験薬	CANP	ババイン	カテプシンB
A	>200000	>100000	410

A: 下記実施例4で得られる化合物

実施例

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例1

N-(L-3-トランス-エトキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-スレオニル-L-イソロイシン ベンジルエステルの製造

L-スレオニル-L-イソロイシン ベンジルエステル1.20g(3.7ミリモル)を酢酸エチル20mlに溶解し、水冷攪拌下L-トランス-エポキシコハク酸 エチル p-ニトロフェニルエステル1.15g(4.1ミリモル)の酢酸エチル10ml溶液を滴下した。水冷下1時間、室温で一夜攪拌した後、酢酸エチル100mlを加え、飽和重曹水100mlで2回、水、5%塩酸水、水、飽和食塩水各100mlで順次攪拌した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: 酢酸エチル: n

-9-

-591-

-10-

ヘキサン = 3 : 2) にて精製し、更に酢酸エチル : n-ヘキサンより再結晶することにより目的物 1.21 g を得た。

I R ν $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ cm^{-1} :

3288, 1750, 1729, 1669, 1646, 1559,
1255, 1198, 899

N M R (CDCl₃) δ (ppm) :

0.87(3H, t, J=7Hz), 0.89(3H, d, J=7Hz),
1.02~1.45(2H, m), 1.10(3H, d, J=7Hz),
1.32(3H, t, J=7Hz), 1.83~2.05(1H, m),
3.42(1H, d, J=4Hz), 3.51(1H, d, J=2Hz),
3.72(1H, d, J=2Hz), 4.20~4.35(1H, m),
4.26(2H, dd, J=2, 7Hz),
4.39(1H, dd, J=2, 8Hz),
4.57(1H, dd, J=5, 9Hz), 5.13(1H, d, J=13Hz),
5.25(1H, d, J=13Hz), 7.02(1H, d, J=9Hz),
7.08(1H, d, J=8Hz), 7.36(5H, s)

M S (E I) ; m/e : 464(M⁺)

- 11 -

3305, 1756, 1746, 1671, 1646, 1550,
1220, 1183, 988

N M R (CDCl₃) δ (ppm) :

0.90(3H, d, J=7Hz), 0.91(3H, t, J=7Hz),
1.05~1.52(2H, m), 1.11(3H, d, J=7Hz),
1.83~2.05(1H, m), 3.44(1H, d, J=4Hz),
3.56(1H, d, J=2Hz), 3.74(1H, d, J=2Hz),
3.76(3H, s), 4.23~4.40(1H, m),
4.38(1H, dd, J=2, 8Hz),
4.51(1H, dd, J=5, 9Hz),
5.19(1H, d, J=12Hz), 5.26(1H, d, J=12Hz),
7.01(1H, d, J=9Hz), 7.07(1H, d, J=8Hz),
7.38(5H, s)

M S (E I) ; m/e : 450(M⁺)

実施例 3

N-(L-3-トランス-ベンジルオキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-スレオニル-L-イソロイシン ベンジルエステルの製造

実施例 2

N-(L-3-トランス-ベンジルオキシカルボニルオキシラン-2-カルボニル)-L-スレオニル-L-イソロイシン メチルエステルの製造

N-tert-ブトキシカルボニル-L-スレオニル-L-イソロイシン メチルエステル 2.72 g (7.9 ミリモル) を 4 N 塩酸-ジオキサン溶液 10 ml に溶解し、室温にて 1 時間攪拌した。反応溶液を減圧乾固し、残渣をクロロホルム 10 ml に溶解し、L-トランス-エポキシコハク酸 ベンジル p-ニトロフェニルエステル 2.95 g (8.6 ミリモル) を加えた。水冷攪拌下トリエチルアミン 874 mg (8.6 ミリモル) のクロロホルム 5 ml 溶液を滴下し、水冷下 2 時間、室温で一晩攪拌した。その後実施例 1 と同様に後処理、精製を行い、目的物 1.65 g を得た。

I R ν $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ cm^{-1} :

- 12 -

実施例 2 と同様にして N-tert-ブトキシカルボニル-L-スレオニル-L-イソロイシン ベンジルエステル 3.18 g (7.5 ミリモル) を 4 N 塩酸-ジオキサン溶液 10 ml を用いて tert-ブトキシカルボニル基を除去した後、トリエチルアミン 838 mg (8.2 ミリモル) 存在下、クロロホルム 15 ml 中で L-トランス-エポキシコハク酸 ベンジル p-ニトロフェニルエステル 2.82 g (8.2 ミリモル) と縮合させた。更に同様に後処理および精製を行い、目的物 2.00 g を得た。

I R ν $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ cm^{-1} :

3271, 1748, 1725, 1647, 1563, 1455,
1391, 1340, 1254, 1223, 973, 851

N M R (CDCl₃) δ (ppm) :

0.86(3H, d, J=7Hz), 0.88(3H, t, J=7Hz),
0.98~1.45(2H, m), 1.07(3H, d, J=7Hz),
1.83~2.05(1H, m), 3.36(1H, d, J=4Hz),
3.54(1H, d, J=2Hz), 3.74(1H, d, J=2Hz),

- 13 -

- 592 -

- 14 -

4.20~4.35(1H, m), 4.37(1H, dd, J=2.8Hz),
4.56(1H, dd, J=5.9Hz), 5.12(1H, d, J=13Hz),
5.17(1H, d, J=9Hz), 5.24(1H, d, J=9Hz),
5.26(1H, d, J=13Hz), 6.99(1H, d, J=9Hz),
7.07(1H, d, J=8Hz), 7.35(5H, s), 7.38(5H, s)

MS(EI); m/e: 526(M⁺)

実施例 4

N-(L-3-トランス-エトキシカルボニル
オキシラン-2-カルボニル)-L-スレオニル-
L-イソロイシンの製造

10%パラジウム炭素20mgをエタノール10mlに懸
濁し、実施例1で得られた化合物500mg(1.1ミリ
モル)のエタノール5ml溶液を加えた。水素気流
下、室温で1時間攪拌した後、触媒を濾去しエタ
ノールで洗浄した。濾液および洗液を合わせ減圧
濃縮し、残渣をエタノールより再結晶することに
より目的化合物314mgを得た。

IR ν $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ cm^{-1} :

-15-

処理後、粗生成物をローバーRP-18カラム(メ
ルク社、溶離液:水:アセトニトリル=8:2)
で精製し、目的物419mgを得た。

IR ν $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ cm^{-1} :

3286, 1733, 1648, 1562, 1440, 1385,
1250, 1151, 896

NMR(DMSO-d₆) δ (ppm):

0.83(3H, d, J=7Hz), 0.85(3H, t, J=7Hz),
1.06(3H, d, J=7Hz), 1.08~1.50(2H, m),
1.67~1.89(1H, m), 3.49(1H, d, J=2Hz),
3.63(3H, s), 3.75(1H, d, J=2Hz),
3.80~3.96(1H, m), 4.25(1H, dd, J=6.9Hz),
4.32(1H, dd, J=5.9Hz), 4.75~5.15(1H, br),
8.22(1H, d, J=8Hz), 8.23(1H, d, J=9Hz)

MS(FAB); m/e: 361(MH⁺)

実施例 6

N-(L-3-トランス-カルボキシオキシラ

3294, 1782, 1721, 1669, 1648, 1556,

1343, 1206, 1027, 874

NMR(DMSO-d₆) δ (ppm):

0.85(3H, t, J=7Hz), 0.86(3H, d, J=7Hz),
1.02~1.55(2H, m), 1.07(3H, d, J=6Hz),
1.23(3H, t, J=7Hz), 1.65~1.90(1H, m),
3.10~3.50(1H, br), 3.64(1H, d, J=2Hz),
3.84(1H, d, J=2Hz), 3.84~3.98(1H, m),
4.10~4.27(3H, m), 4.35(1H, dd, J=5.8Hz),
8.05(1H, d, J=8Hz), 8.30(1H, d, J=8Hz),
11.50~13.50(1H, br)

MS(FAB); m/e: 375(MH⁺)

実施例 5

N-(L-3-トランス-カルボキシオキシラ
ン-2-カルボニル)-L-スレオニル-L-イ
ソロイシン メチルエステルの製造

実施例4と同様にして、実施例2で得られた化
合物709mg(1.6ミリモル)を10%パラジウム炭素25
mgを用い、メタノール20ml中で接触還元した。後

-16-

ン-2-カルボニル)-L-スレオニル-L-イ
ソロイシンの製造

実施例4と同様にして、実施例3で得られた化
合物1.05g(1.2ミリモル)を10%パラジウム炭素
70mgを用い、メタノール20ml中で接触還元した。
後処理後、粗生成物をセファデックスG-10
(ファルマシア社)を充填したカラム(溶離液:
水)で精製し、凍結乾燥により目的物529mgを得
た。

IR ν $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ cm^{-1} :

3409, 1730, 1656, 1541, 1459, 1386,
1215, 898

NMR(DMSO-d₆) δ (ppm):

0.84(3H, t, J=7Hz), 0.85(3H, d, J=7Hz),
1.05(3H, d, J=6Hz), 1.08~1.55(2H, m),
1.65~1.87(1H, m), 3.44(1H, d, J=2Hz),
3.71(1H, d, J=2Hz), 3.82~3.98(1H, m),
4.17(1H, dd, J=6.8Hz),

-17-

-18-

特開平 2-304075(6)

4.33(1H, dd, J=5.8Hz) , 4.75~6.50(1H, br) ,
8.03(1H, d, J=8Hz) , 8.18(1H, d, J=8Hz) ,
9.50~13.50(2H, br)
MS (FAB) ; m/e : 347(MH⁺)

特許出願人 大正製藥株式会社
代理人 弁理士 北川 富造

- 19 -